

В.И.Новоселов, Э.К.Мубаракшина, В.А.Янин, С.Е.Амелина, Е.Е.Фесенко

Роль антиоксидантных систем в регенерации эпителия трахеи после термического ожога верхних дыхательных путей

Институт биофизики клетки РАН, Пушкино

V.I.Novoselov, E.K.Mubarakshina, V.A.Yanin, S.E.Amelina, E.E.Fesenko

Contribution of antioxidant systems to regeneration of tracheal epithelium after burn of upper respiratory tract

Summary

Study was performed using a rat model of thermal burn of upper respiratory tract (URT). The URT burn in rats was induced by intratracheal instillation of 70 °C water vapor using a micro-vapor generator. In a week after the intervention about 50 % of the ciliated epithelium was destructed. In 2 weeks after the intervention the inflammatory response enhanced and tissue edema increased. In 4 weeks after the intervention partial irregular restoration of tracheal epithelium cells was observed. Both IL-1 and IL-4 expression did not change significantly during restoration of tracheal epithelium, but IL-8 and IL-10 expression increased and was high even 1 month after the burn. Simultaneously, dramatic increase in expression of peroxiredoxin 6, which is the main antioxidant protein in trachea, was observed during regeneration of trachea epithelium. Immunohistochemical investigations showed that the increase in peroxiredoxin 6 in trachea during the regeneration of trachea epithelium after the burn could be related to increased peroxiredoxin expression in goblet cells. Therefore, activation of peroxiredoxin 6 synthesis by goblet cells appears to be the key step in activation of epithelium defense systems after thermal burn.

Резюме

Исследование проводили с использованием модели термического ожога верхних дыхательных путей крысы. Ожог верхних дыхательных путей крысы проводился с помощью микропарогенератора путем введения пара 70 °C непосредственно в трахею. Через 1 нед. после ожога наблюдается разрушение реснитчатого эпителия трахеи на 50 %. Через 2 нед. после ожога наблюдается усиление воспалительной реакции, увеличение отека ткани. Через 4 нед. после ожога наблюдается частичное и неравномерное восстановление различных типов клеток эпителия трахеи. Уровень экспрессии интерлейкинов 1 и 4 (IL-1 и IL-4) существенно не изменялся в период восстановления эпителия трахеи после ожога, в то время как уровень экспрессии IL-8 и IL-10 повышался и оставался очень высоким даже через 1 мес. после ожога. Одновременно было показано резкое повышение экспрессии пероксиредоксина-6 (основного белка-антиоксиданта в трахее) на всех этапах регенерации эпителия трахеи после ожога. На основании иммуногистохимических исследований было показано, что этот повышенный уровень содержания пероксиредоксина-6 в трахее в процессе восстановления эпителия трахеи после ожога связан с повышенной экспрессией пероксиредоксина-6 в бокаловидных клетках трахеи. Это свидетельствует о том, что активация синтеза пероксиредоксина-6 бокаловидными клетками является одним из ключевых звеньев в активации защитных систем в эпителии после термического ожога.

Термические ожоги органов дыхания, сопровождающиеся массовой гибелью клеток эпителиальных тканей (слизистые трахеи, бронхов), приводят к исключительно тяжелым последствиям для здоровья человека, а лечение больных при таких травмах представляет собой длительный и сложный процесс. Поэтому чрезвычайно важным является исследование ключевых систем в процессе заживления органов дыхания при данных патологических процессах.

В настоящее время является общепризнанным участие активных форм кислорода (АФК) в молекулярных механизмах патогенеза болезней легких. Показано, что ожоги сопровождаются резким увеличением в пораженных тканях АФК, которые являются повреждающим фактором для выживших клеток. Основные источники этих АФК — метаболиты погибших клеток и активация нейтрофилов ("респираторный взрыв"). Соответственно, при регенерации поврежденного эпителия одним из решающих процессов является восстановление баланса окислители—антиоксиданты.

В трахее и бронхах легких нами идентифицирован новый представитель белков-антиоксидантов — секреторный пероксиредоксин-6 (EMBL/GenBank, Y17295) [1, 2]. Как показали наши прямые эксперименты, его вклад в нейтрализацию АФК в трахее и бронхах составляет около 75 % [3–5]. Таким образом, пероксиредоксин-6 является одним из основных антиоксидантов верхних дыхательных путей, и поведение пероксиредоксина фактически определяет степень эффективности антиоксидантной защиты. Выявлению роли антиоксидантных систем, в первую очередь пероксиредоксинов, в репарационных процессах при термических ожогах органов дыхания посвящена данная работа.

Материалы и методы

В экспериментах использовали крыс линии Вистар мужского пола весом 150–200 г. Ожог верхних дыхательных путей производили с помощью микропарогенератора МПГ-1-05. Животных анестезировали

гексеналом (75 мг на 1 кг веса крысы), фиксировали на препарационном столике, с помощью специального расширителя раздвигали челюсти, под контролем бинокулярной лупы в переднюю часть трахеи вводили тонкий зонд от парагенератора на расстояние 2–3 мм от начала трахеи и проводили ожог эпителия трахеи. Температура пара — 70 °С, скорость подачи пара — 1,2 мл/с, время экспозиции — 4 с. Расчет показал, что при данных параметрах поражался участок трахеи длиной 45 мм на глубину 0,2 мм, т. е. на всю глубину эпителия.

Иммуногистохимия

Для проведения гистологических исследований ожога выделяли трахею, полученные образцы держали в фиксаторе (3%-ный параформальдегид и 1%-ный глютаровый альдегид на 0,1 М натрий-какодилатном буфере при pH 7,2–7,4 с добавлением 75 мМ сахарозы) < 12 ч. Образцы обезживали и помещали в смесь ацетона и эпоксидной смолы (1 : 1) на ночь. После пропитки смесью образцы заливали в эпоксидную смолу, состоящую из следующих компонентов: раствор *Araldite M* (22,5 мл), раствор *Epon 812* (22,5 мл), раствор *Epon Hardener DDSA* (60 мл) и раствор *Epon Accelerator DMP 30* (0,6 мл), — и полимеризовали при 37 °С в течение 12 ч и при 56 °С 2 сут. Срезы (1–1,5 мкм) окрашивали метиленовым синим и фуксином. Исследования проводили на световом микроскопе "ЛОМО МИКМЕД-2", срезы фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата *Olimpus*, изображения обрабатывали на компьютере в программе *Photoshop*.

Для иммуногистохимических исследований использовали парафиновые срезы толщиной 3 мкм, полученные стандартным методом. В качестве первичных антител использовали кроличьи антитела против пероксиредоксина-6, в качестве вторичных антител — антикроличий конъюгат с щелочной фосфатазой.

Иммуноферментный анализ

В качестве первичных антител в случае цитокинов использовали моноклональные антитела против цитокинов (*USBiological*, США), в случае пероксиредоксина-6 — кроличьи поликлональные антитела, полученные в лаборатории.

Для получения экстракта белков трахеи крысу усыпляли вероналом (100 мг на 1 кг веса животного), выделяли трахею, проводили соскоб эпителия узким шпателем. Соскоб из 1 трахеи помещали в 200 мкл физраствора и объединяли соскоб от 3 трахей. Полученную суспензию центрифугировали при 2 000 g в течение 10 мин и доводили полученный раствор белка до концентрации 1 мг/мл с помощью физраствора.

Иммуноферментный анализ проводили стандартным методом, используя в качестве вторичного антитела антимышиный или антикроличий конъюгат с пероксидазой хрена.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Результаты

При микроскопическом исследовании поперечных срезов трахеи (рис. 1) через 1 нед. после ожога (рис. 1б) наблюдается разрушение реснитчатого эпителия на 50 %. Встречаются участки с разрушенной слизистой оболочкой, в которой видны скопления тучных клеток и лимфоцитов. В неповрежденной части эпителия наблюдаются секретирующие бокаловидные клетки. Мерцательный эпителий местами слущен. Встречаются опустошенные бокаловидные клетки. Происходит отслоение слизистой и подслизистой оболочки от фиброзно-хрящевой оболочки в результате образования воспалительного экссудата.

Через 2 нед. после ожога (рис. 1в) усилилась воспалительная реакция, увеличился отек ткани. Встречались участки с кровоизлиянием в подслизистый слой.

Анализ состояния трахеи через 3 нед. после ожога (рис. 1г) показал, что процессы восстановления эпителия не охватывают всей слизистой трахеи ожога. Воспалительная реакция сохраняется, на отдельных участках эпителий дедифференцирован и клеточный слой представлен базальными клетками. Местами происходит отслоение слизистой оболочки от подслизистой.

Через 4 нед. после ожога (рис. 1д) наблюдается частичное и неравномерное восстановление различных типов клеток эпителия трахеи. Встречаются как участки с преобладанием реснитчатых клеток, так и участки, представленные преимущественно секреторными клетками, по сравнению с нормой. Воспаление сохраняется, вследствие чего кровеносные сосуды расширены и в просвете их видны эритроциты. Отек ткани уменьшается.

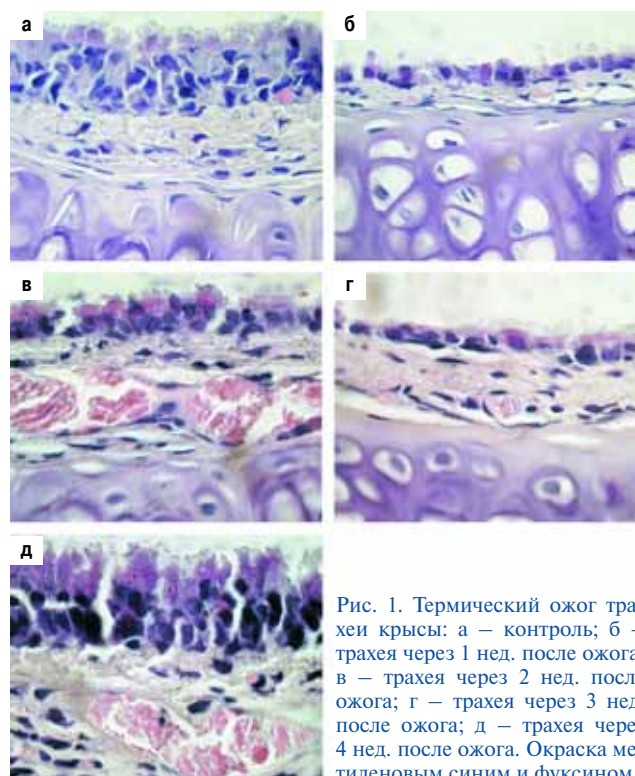


Рис. 1. Термический ожог трахеи крысы: а — контроль; б — трахея через 1 нед. после ожога; в — трахея через 2 нед. после ожога; г — трахея через 3 нед. после ожога; д — трахея через 4 нед. после ожога. Окраска метиленовым синим и фуксином

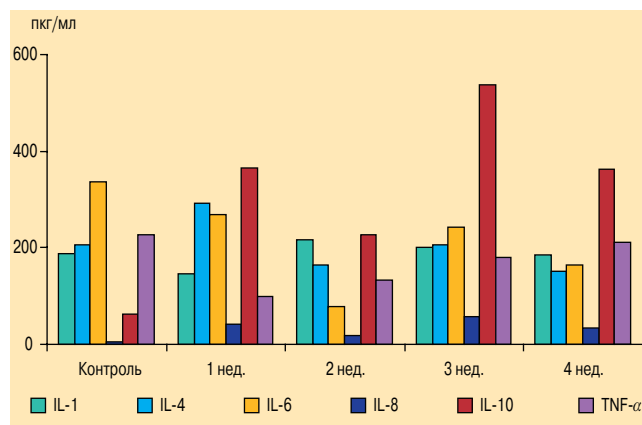


Рис. 2. Содержание разных цитокинов в эпителии трахеи крысы после термического ожога. Количество цитокинов выражено на 1 мл экстракта эпителия трахеи

Таким образом, морфологическая картина при гистологическом исследовании подтверждает глубину и стадийность процесса при ожоге слизистой трахеи.

Чтобы выявить участие основных факторов в восстановлении эпителия, была исследована динамика экспрессии пероксиредоксина-6, различных цитокинов и фактора некроза опухолей после термического ожога верхних дыхательных путей.

На рис. 2 представлены результаты, полученные при исследовании динамики экспрессии цитокинов в эпителии обожженной трахеи. Уровень экспрессии интерлейкинов 1 и 4 (IL-1 и IL-4) существенно не изменялся, в то время как уровень экспрессии IL-8 сначала повышался (через 1 нед.), потом после некоторого спада вновь существенно поднимался (через 3 нед.) и оставался очень высоким даже через 1 мес. Так как IL-8 указывает на присутствие в эпителии макрофагов, резкое увеличение количества макрофагов в эпителии во всех периодах после ожога свидетельствует о длительном воспалительном процессе в трахее. Аналогичные результаты получены и для IL-10, который в принципе действует противоположным образом, по сравнению с IL-8, и не позволяет перейти воспалительному процессу в неконтролируемое состояние.

Наиболее заметными были изменения экспрессии пероксиредоксина-6 (рис. 3). В течение 1-й нед. после ожога уровень экспрессии пероксиредоксина увеличивался в несколько раз и потом постепенно

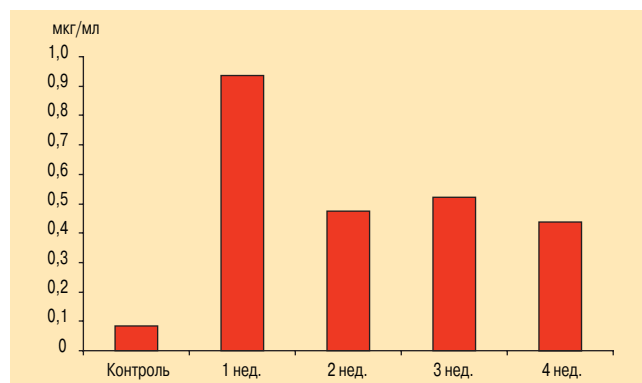


Рис. 3. Содержание пероксиредоксина-6 в эпителии трахеи крысы после термического ожога (на 1 мл экстракта эпителия трахеи)

снижался в течение 1 мес. Более того, при исследовании динамики экспрессии пероксиредоксина-6 в первые несколько часов после ожога было показано, что уровень содержания пероксиредоксина-6 в трахее начинает существенно повышаться за 1-й ч после ожога (данные не приведены). Это, по-видимому, связано в основном с повышенной секрецией пероксиредоксина-6 бокаловидными клетками. Последующий резкий рост его уровня в эпителии уже не может быть объяснен повышенной секрецией, т. к. при этом произошло бы истощение бокаловидных клеток. Таким образом, после ожога включается механизм резкого повышения экспрессии пероксиредоксина-6 в бокаловидных клетках.

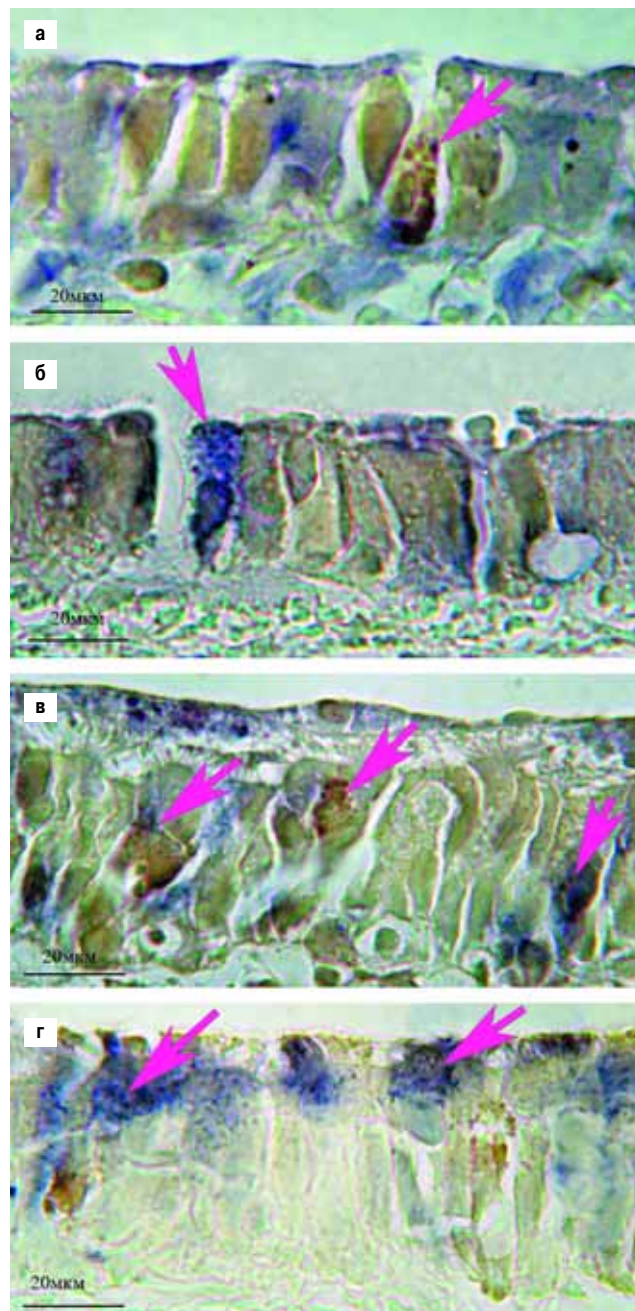


Рис. 4. Иммуногистохимическое выявление пероксиредоксина-6 после термического ожога трахеи: а — контроль; б — через 1 нед. после ожога; в — через 2 нед. после ожога, г — через 3 нед. после ожога. Стрелки показывают интенсивно синтезирующие пероксиредоксин-6 бокаловидные клетки в трахее

Чтобы проверить, было ли повышение уровня пероксиредоксина-6 в трахее при восстановлении после термического ожога связано с повышенным содержанием пероксиредоксина в бокаловидных клетках трахеи, было проведено иммуногистохимическое исследование.

На рис. 4 показана локализация пероксиредоксина-6 в клетках эпителия трахеи. Подтверждено, что основным источником пероксиредоксина-6 являются бокаловидные клетки, которые сохраняются и после термического ожога. Более того, их процентное содержание в эпителии повышается, что, по-видимому, связано с гибелью реснитчатых клеток при сохранении бокаловидных.

Обсуждение

Различные тяжелые патологии верхних дыхательных путей сопровождаются массовой гибелью клеток эпителия трахеи и бронхов. В нашем случае — при термическом ожоге верхних дыхательных путей — в основном гибнут реснитчатые клетки, которые, по-видимому, наиболее чувствительны к внешнему воздействию среди клеток эпителия трахеи и бронхов. В последующем активируются многие репарационные процессы в эпителии, которые предназначены для восстановления клеточного состава эпителия и включают в себя повышенную экспрессию различных цитокинов, синтез специфических матричных белков-металлопротеинов и т. д. [6].

Заключение

В настоящей работе исследовалось поведение антиоксидантных систем при термическом ожоге верхних дыхательных путей. Следует особо отметить, что массовая гибель клеток в эпителии сопровождается резким ростом свободных форм кислорода, основным источником которых являются метаболиты раз-

рушенных клеток. Основным антиоксидантом в трахее и бронхах легких является пероксиредоксин-6, который синтезируется и секретируется бокаловидными клетками. Как показали данные исследования, эти клетки более устойчивы к внешним воздействиям, что позволяет сохранять высокий уровень пероксиредоксина-6 в эпителии. Более того, уровень экспрессии пероксиредоксина-6 увеличивается после термического ожога. Это свидетельствует об активации синтеза пероксиредоксина-6 этими клетками, что, по-видимому, является одним из ключевых процессов активации защитных систем в эпителии после термического ожога.

Эта работа поддержана грантами "Молекулярная и клеточная биология" и РФФИ 08-04-00707.

Литература

1. Peshenko I.V., Novoselov V.I., Evdokimov V.A. et al. Novel 28-kDa secretory protein from rat olfactory epithelium. *FEBS Lett.* 1996; 381: 12–14.
2. Peshenko I.V., Novoselov V.I., Evdokimov V.A. et al. Identification of a 28-kDa secretory protein from rat olfactory epithelium as a thiol-specific antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998; 25: 654–659.
3. Новоселов В.И., Амелина С.Е., Кравченко И.Н. и др. Роль пероксиредоксина в антиоксидантной системе органов дыхания. *Докл. РАН* 2000; 375, 831–833.
4. Chuchalin A.G., Novoselov V.I., Shifrina O.N. et al. Peroxiredoxin VI in human respiratory system. *Respir. Med.* 2003; 97: 147–151.
5. Novoselov S.V., Peshenko I.V., Popov V.V. et al. Localization of the 28-kDa peroxiredoxin in rat epithelial tissues and its antioxidant properties. *Cell Tissue Res.* 2001; 298: 471–480.
6. Coraux C., Roux J, Jolly T., Birembaut P. Epithelial cell-extracellular matrix interaction and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2008; 5: 689–694.

Поступила 09.10.08

© Коллектив авторов, 2008

УДК 616.211/231-001.17-092